食用油脂中の酸化防止剤の同時定量法について

(昭和 47 年 12 月 27 日受理)

兼 松 弘* 丸 山 武 紀* 木 下 葉 子*
新 谷 勛* 今 村 正 男*

On the Simultaneous Determination of Antioxidants in Edible Oil and Fat

Hiromu KANEMATSU, Takenori MARUYAMA, Yoko KINOSHITA,
Isao NIIYA and Masao IMAMURA

Japan Margarine and Shortening Inspection Association, Foundation
(27-8, Nihonbashi Hamacho, 3-Chome, Chuo-ku, Tokyo)

In order to carry out simultaneous determination of six kinds of synthetic antioxidant in edible oils, the oil was dissolved in pentane and extracted with acetonitrile saturated with pentane. A definite quantity of benzophenone was added to the extract as internal standard, and the solution was concentrated by Kuderna-Danish concentrator. A small amount of the oil that separated from antioxidants on thin-layer chromatogram was removed, and extracted antioxidants and benzophenone were submitted to gas-liquid chromatography as a trimethylsilane derivatives. Recovery rates of *n*-propyl gallate and *iso*-amyl gallate were slightly lower and precisions of determination were also lower than others, however, the determination of butyl hydroxy anisol, dibutyl hydroxy toluene, ethyl protocatechuate and nordihydroguaiaretic acid were fully satisfactory.

(Received December 27, 1972)

1. ま え が き

油脂食品の酸化防止剤として現在食品衛生法に各種の合成品あるいは天然品が許可されている。しかし現在のところ、わが国で実際に使用されている酸化防止剤はトコフェロールなどの天然品を除外すると、合成品ではブチルヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキシルエーテル以外は見当たらない。

これら合成酸化防止剤の分析については多くの方法が報告されているが^{1), 2)}、今後貿易の自由化が進むにつれてさらに輸入品の多くなることも予想されるので、食品衛生法で許可されている他の酸化防止剤も定量することが必要と考える。しかし文献による方法はかなりみられるが、それらはそれぞれ特徴があり、操作が複雑であったり特殊の分析機器を必要とするため一般的でない場合が多い。しかもこれらは対照食品により種類、量が規制されているため単独使用よりも混合製剤として使用されることが多い。そのうえ各酸化防止剤はそれぞれ性質が異なることから系統的に同時分析することは困難視され

ていた。

本報では6種類の合成酸化防止剤を同時に定量する方法について検討を行なったので報告する。

2. 試料および実験方法

2-1. 試 料

使用した合成酸化防止剤はつぎに示す6種類でいずれも市販品をそのまま用いた。

- 1) butyl hydroxy anisol (BHA) 和光純薬工業 K.K.
- 2) dibutyl hydroxy toluene (BHT)
和光純薬工業 K.K.
- 3) ethyl protocatechuate (EP) 東京化成工業 K.K.
- 4) *n*-propyl gallate (PG) 東京化成工業 K.K.
- 5) *iso*-amyl gallate (IAG) 東京化成工業 K.K.
- 6) nordihydroguaiaretic acid (NDGA)
半井化学薬品 K.K.

またガスクロマトグラフィーでの内部標準物質としてペンゾフェノン (和光純薬工業 K.K.) を用いた。なお添加回収実験のための対照油脂としてショートニング、大豆白絞油およびバターを用いた。

* (財)日本マーガリン検査協会：東京都中央区日本橋浜町 3-27-8

2-2. 実験方法

2-2-1. ガスクロマトグラフィー (GLC)

試料はすべて常法により trimethylsilyl (TMS) 誘導体としたのち GLC 分析に供した。すなわち6種類の酸化防止剤およびベンゾフェノンそれぞれ約 1 mg ずつ共センつき小試験管に正確に秤取し無水ピリジン 1 ml に溶解, hexamethyl disilazane (HMDS) 0.2 ml および trimethyl chlorosilane (TMCS) 0.1 ml を加えたのち共センをし、はげしく振り混ぜたのち静置し、その上澄液をそのまま GLC に注入した。

GLC は日立製 073 型 (FID 付) を用い、つぎに示すような条件で分析を行なった。

カラム: 10% SE-30/Chromosorb W (80/100 mesh)

3 mm×1 m ステンレススチール

キャリアガス: N₂ 30 ml/min

カラム温度: 150° → 300° (5°/min)

注入口温度: 270°

2-2-2. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

20×20 cm のガラス板上に常法どおりケイソウ土 (Merck 製 Kieselgel) を 500 μ の厚さに塗布し、室温で1時間風乾後、110°, 2時間で活性化してデシケター中で放冷後使用した。装置は東洋科学産業製東洋展開装置 CF を用いた。酸化防止剤抽出液は内部標準液を一定量正確に添加、濃縮後 (約 1 ml) マイクロシリンジで約 300 μl 帯状に塗布し、後述のように、アセトニルおよびベンゼンで上昇法により展開した。

2-2-3. 試料の濃縮方法

酸化防止剤の抽出溶液はベンゾフェノン 1 mg (1,000 ppm のヘキサン溶液 1 ml) を加えたのちクデルナ・ダニッシュ濃縮器を用い、50° で試料溶液が 1 ml になるまで減圧濃縮した。

3. 結果および考察

3-1. ガスクロマトグラフィーによる定量

BHA, BHT 以外の酸化防止剤は分子内に -OH 基を数個有するためカラムに吸着され、ピークとして検出することはできない。しかしこの -OH 基を TMS 誘導体にする Fig. 1 に示すように、6種類の酸化防止剤および内部標準物質として用いたベンゾフェノンともに検出することができた。

西本ら⁹⁾はこの TMS 誘導体の GLC 分析について検討を行なっているが、1.5% SE-30, カラム 2.25 m, 190°, N₂ ガス 30 ml/min の条件で各酸化防止剤の溶出順序は BHA, BHT, EP, PG, IAG の順であると報告している。しかし著者らの研究では Fig. 1 に示すように BHT, BHA, EP, PG, IAG, NDGA の順に溶出した。BHA と BHT の場合のみ西本らの結果と異なるがこの原因については不明である。なお非エステル化の場合は BHA, BHT の順であった。

つぎに内部標準物質ベンゾフェノンに対する各酸化防

止剤の重量比と GLC ピーク面積比とからそれぞれ相対感度および再現性について検討した結果は Table 1 に示した。

相対感度はいずれも 1.0 以上であるが、ややバラツキがみられ、各酸化防止剤とも平均値に対するバラツキは最大約 4% であった。したがって本法による測定誤差は最大 ±4% である。

3-2. 油脂からの抽出

3-2-1. 液-液分配

対象食品の種類により、酸化防止剤を食品から抽出する段階で操作法が異なる。油脂からの BHA, BHT の抽出には *n*-ヘキサン-アセトニトリルの液-液分配が一般に用いられているが、*n*-ペンタン-アセトニトリル系のものは *n*-ヘキサン-アセトニトリル系に比べて抽出効率のよいことが報告されている⁴⁾。本研究では BHA, BHT のみならず PG など多種類の酸化防止剤の同時抽出を目的とするため、液-液分配における最適溶媒系を見いだすことがまず必要である。そこでアセトニトリルを基にした5種類の液-液分配を用いて各種酸化防止剤の転溶率から最適分配系について検討した。

n-ヘキサン, *n*-ペンタン, 石油エーテル, 石油ベンジンおよびシクロヘキサンの各 50 ml に各種酸化防止剤 1 mg を添加し、アセトニトリル 50 ml で1回抽出した液-液分配の結果は Table 2 に示すように BHA, EP, PG, IAG, NDGA はいずれの分配系でも抽出率は高く、BHT のみきわめて低いことがわかった。また各分配系での差異についてみると、*n*-ペンタン-アセトニトリル系のものがもっとも抽出率が高い。しかし *n*-ペンタンのアセトニトリル層への移行量もまた多い。

いずれの分配系でも Table 2 に示すように、溶媒の移行は避けられないため多量の油脂の転溶も予想される。そこで *n*-ペンタン-アセトニトリル, *n*-ヘキサン-アセトニトリルおよび石油ベンジン-アセトニトリルの溶媒系で各溶液を相互に飽和した液-液分配について検討した。なお Table 2 の結果から BHA と EP, PG, IAG, NDGA の転溶挙動は同様とみなし、BHA と BHT について行なった。各液-液分配の抽出回数 (毎回 50 ml) と抽出率についてみると、Table 3 に示すように毎回の抽出効率は不飽和溶液での液-液分配に比べて低く、また抽出回数の増加にしたがって抽出量は増加した。

油脂食品に添加された酸化防止剤を正確に定量するためには完全な回収率が望ましいのは当然であるが、日常の分析業務としては所要時間が短かく、再現性のあるルーチンな方法が望ましい。そこで *n*-ペンタン (50 ml)-*n*-ペンタン飽和アセトニトリル (50 ml) の液-液分配を4回くり返した場合 BHT, BHA の回収率はそれぞれ 92.2%, 96.5% であることから本条件は一応満足すべきものと考えられる。

Fig. 1. Gas chromatogram of TMS derivatives of antioxydants and benzophenone
 BHT: dibutyl hydroxy toluene; BHA: butyl hydroxy anisol; BP: benzo-
 phenone; EP: ethyl protocatecuete; PG: *n*-propyl gallate; IAG: *iso*-amyl
 gallate; NDGA: nordihydroguaiaretic acid

Table 1. Relative Response of Various Antioxydants vs. Benzophenone

n	BHT	BHA	EP	PG	IAG	NDGA
1	1.18	1.26	1.28	1.30	1.28	1.41
2	1.21	1.28	1.23	1.22	1.16	1.23
3	1.13	1.27	1.19	1.24	1.19	1.33
4	1.12	1.18	1.25	1.26	1.24	1.30
5	1.14	1.26	1.20	1.25	1.23	1.40
$\bar{X}$	1.16	1.25	1.23	1.25	1.22	1.33

Table 2. Recovery of added Antioxydants in *n*-pentane and Removal of Solvent
 by Various Extraction Systems

Solvent- acetonitrile	Removal of solvent (%)	BHT (%)	BHA (%)	EP (%)	PG (%)	IAG (%)	NDGA (%)
<i>n</i> -Hexane-	6	39.0	92.5	98.2	91.1	83.3	100.0
<i>n</i> -Pentane-	20	51.0	94.8	98.3	89.5	81.7	100.0
Petroleum ether-	6	37.3	83.3	98.1	79.2	61.5	96.6
Petroleum benzine-	8	47.8	94.5	99.1	92.3	86.5	99.2
Cyclohexane-	8	46.2	79.4	95.5	95.5	96.6	97.1

Table 3. Relation Between Recovery of added BHA, BHT and Extraction Times by Acetonitrile Saturated with Various Solvent Extraction

Extraction (times)	Acetonitrile saturated with <i>n</i> -hexane		Acetonitrile saturated with <i>n</i> -pentane		Acetonitrile saturated with petroleum benzene	
	BHT (%)	BHA (%)	BHT (%)	BHA (%)	BHT (%)	BHA (%)
1	30.8	87.1	48.9	82.5	45.8	84.1
2	53.9	95.3	72.5	89.1	65.3	93.3
3	72.1	96.9	85.2	94.5	77.1	96.6
4	83.3	97.8	92.2	96.5	85.1	99.5
5	91.3	98.2	97.1	98.3	90.8	100.0
Remaining	8.7	1.8	2.9	1.7	9.2	0.0

Table 4. Relation Between Recovery of added BHA, BHT and Amount of Acetonitrile Saturated with Pentane (50 ml, 4 times extraction)

Solvent (ml)	75	50	30	15
BHT (%)	95.2	92.2	79.1	53.2
BHA (%)	98.4	96.5	94.3	93.0

Table 5. Removal of Oils and Fats to Solvent by Acetonitrile Saturated with *n*-Pentane Extraction

Kinds of oils and fats	Saponification value	Iodide value	Removal of oils and fats (%)
Shortening	213.5	8.6	7.7
Soybean oil	190.1	129.3	4.5
Butter fat	228.0	29.5	10.4

Fig. 2. Chromatograms showing separation of antioxydants, benzophenone and oils on Kieselgel plate

Table 6. Recovery of added Antioxydants from TLC Plate by Ethyl Ether Extraction

n	BHT (%)	BHA (%)	PE (%)	PG (%)	IAG (%)	NDGA (%)
1	101.7	99.2	97.0	91.6	91.1	89.1
2	99.8	97.6	99.4	94.8	88.7	91.4
3	99.9	101.6	97.8	93.2	90.3	89.3
$\bar{X}$	100.5	99.5	98.1	93.2	90.0	89.9

Fig. 3. Gas chromatogram of TMS derivative of added antioxydants (100 ppm) in shortening oil

Table 7. Recovery of added Antioxydants in Shortening Oil

Added (ppm)	n	BHT (%)	BHA (%)	EP (%)	PG (%)	IAG (%)	NDGA (%)
50	1	94.8	96.6	101.0	86.2	83.1	103.6
	2	96.1	102.2	103.1	89.0	87.2	102.8
	3	98.6	99.2	96.5	80.3	85.8	98.2
	$\bar{X}$	96.5	99.3	100.2	85.1	85.4	101.5
100	1	101.9	98.4	96.4	87.3	91.5	99.1
	2	96.5	99.3	104.4	81.6	89.3	103.9
	3	98.9	99.0	92.0	90.7	82.6	95.1
	$\bar{X}$	99.1	98.9	97.6	86.5	87.8	99.4
200	1	98.2	99.8	101.9	81.2	87.5	98.3
	2	103.5	98.5	102.7	89.0	85.1	103.6
	3	104.1	101.6	99.6	84.7	93.6	102.5
	$\bar{X}$	101.9	99.9	101.4	84.9	88.7	101.5

Fig. 4. Scheme of procedure to determine antioxidants in edible oils and fats.

3-2-2. 抽出溶媒量と抽出率

ついで *n*-ペンタン-*n*-ペンタン 飽和アセトニトリル 液一液分配において *n*-ペンタン量が 50 ml での毎回用いる抽出溶媒の最適値について検討した。結果は Table 4 に示すように抽出溶媒量が多くなるにしたがい抽出率は向上し、とくに BHA ではこの傾向が顕著であった。しかし溶媒の量 50 ml と 75 ml の場合で比較してみても、それほど大きな相異はみられず、いずれも 90% 以上の抽出率を示した。このことから毎回の抽出溶媒量は 50 ml で十分である。

つぎに、以上の条件で抽出を行なった場合の溶媒への油脂の移行量をみるため、ショートニングオイル、大豆白絞油、バター脂で行なったところ、Table 5 に示すように移行量はバター脂、ショートニングオイル、大豆白絞油の順に大であった。これらの油脂のケン化価はバター脂、ショートニングオイル、大豆白絞油の順に大であった。アセトニトリル層への油脂の移行量とこれら油脂の組成との関連についてみると、ヨウ素価との関連はみられず、したがって融点にも影響されない。しかしケン化価の場合は明瞭な関連がみられ、ケン化の大きいほど、すなわち分子量の小さいグリセリドを多く含むほど移行量も多くなることがわかった。

3-3. TLC による移行油脂の除去

抽出の際約 10% 以下の油脂の移行はまぬがれないことが判明したが、これは除去しなければならない。この方法として TLC を用いた。固定相 Kieselgel (厚さ 500 μ) に各種の酸化防止剤をスポットし、アセトニトリルでの展開では Fig. 2 に示すように PG, IAG および油

脂は原点からの移動がみられない。またベンゼンで展開すると PG, IAG は原点からの移動は起こらないが他は移動することがわかり、この 2 つの展開溶媒を組合せて分取 TLC を行なった。

試料を帯状に塗布し、最初にアセトニトリルで 10 cm 展開し、展開液が、10 cm に到達後、約 10 分間放置して BHT, BHA, EP, NDGA とベンゾフェノンを上端に集め、風乾後さらにベンゼンで 4 cm 展開し同様にベンゼンが 4 cm に到達後、約 10 分間放置して油脂を原点より 4 cm のところに集める。そして原点に残った PG, IAG と先端にある酸化防止剤 (BHT, BHA, EP, NDGA) およびベンゾフェノンを薄層板よりかきとる。

酸化防止剤をカラムクロマトグラフィーで分離溶出する場合、吸着剤の種類によっては溶出されにくいことがあり、分取した薄層担体から抽出する場合にも抽出溶媒量および定量精度について検討する必要がある。結果は Table 6 に示すようにエーテル約 50 ml を使用した場合 BHT, BHA, EP はほぼ全量抽出されるが、他は PG, IAG, NDGA の順に回収率の低下がみられる。これは吸着剤からの脱着の難易さに起因するものと考えられる。

4. 添加回収実験

酸化防止剤を含まないショートニングオイルに各酸化防止剤を 50, 100 および 200 ppm 添加して試料を調製、それから 10 g を精秤し、*n*-ペンタン 50 ml に溶かし、アセトニトリル抽出を行ない、これに内部標準物質としてベンゾフェノン 1 mg (1,000 ppm のヘキサン溶液 1 ml) を添加し濃縮、TLC, 抽出, TMS 誘導体, GLC と各操作を行ない添加回収実験を行なった。Fig. 3 はそれぞれ 100 ppm 添加した場合のガスクロマトグラムの一例である。油脂中の他の微量成分および完全に除去しきれなかったトリグリセリドのピークが同時に検出されてはいるが、酸化防止剤および内部標準物質とは分離し十分定量することができる。

n-ペンタン-アセトニトリル分配での補正值、薄層担体から抽出の際の回収率および GLC での相対感度をそれぞれ補正定量した結果は Table 7 に示すとおりである。BHA, BHT, EP, NDGA は十分満足できる結果が得られたが、PG および IAG は回収率がやや低く定量精度も若干低いものと思われる。

5. 総括

以上の結果から分析方法のフローシートを Fig. 4 に示した。また本法における特徴を列挙するとつぎのとおりである。

1) 6 種類の合成酸化防止剤および内部標準ベンゾフェノンを TMS 誘導として昇温 GLC を行なうと個々の成分は完全に独立したピークとして得られるため同時定量が可能であった。さらに液相に SE-30 を用いるため高温での aging が可能であり ghost 現象の防止がで

きた。

2) *n*-ペンタン-*n*-ペンタン飽和 アセトニトリルの液-液分配により回収率は向上し、抽出液への油脂の移行をある程度防止することができた。

3) BHA, BHT のみを対象とする場合、トリグリセリドの溶出ピークよりも低温領域に溶出するため少量の油脂が混入しても定量精度に影響を与えない。したがってこの場合は TLC および TMS 誘導体にする操作は省略することができる。ただしこの場合は 300° の aging が必要である。

なお本報の要旨は昭和47年10月日本食品衛生学会第24回学術講演会（秋田）で講演した。

文 献

- 1) 川城 巖, 細貝 祐太郎: 食衛誌. **3**, 297 (1962); **4**, 225 (1963); **6**, 44 (1965); **7**, 271 (1966); **8**, 474 (1967).
- 2) Stucky, B. N., Osborne, C. E.: J. Am. Oil Chem. Soc., **42**, 228 (1965).
- 3) 西本孝男, 上田雅彦: 食衛誌. **5**, 287 (1964).
- 4) 佐藤洋子, 河村太郎: 食衛誌. **13**, 47 (1972).